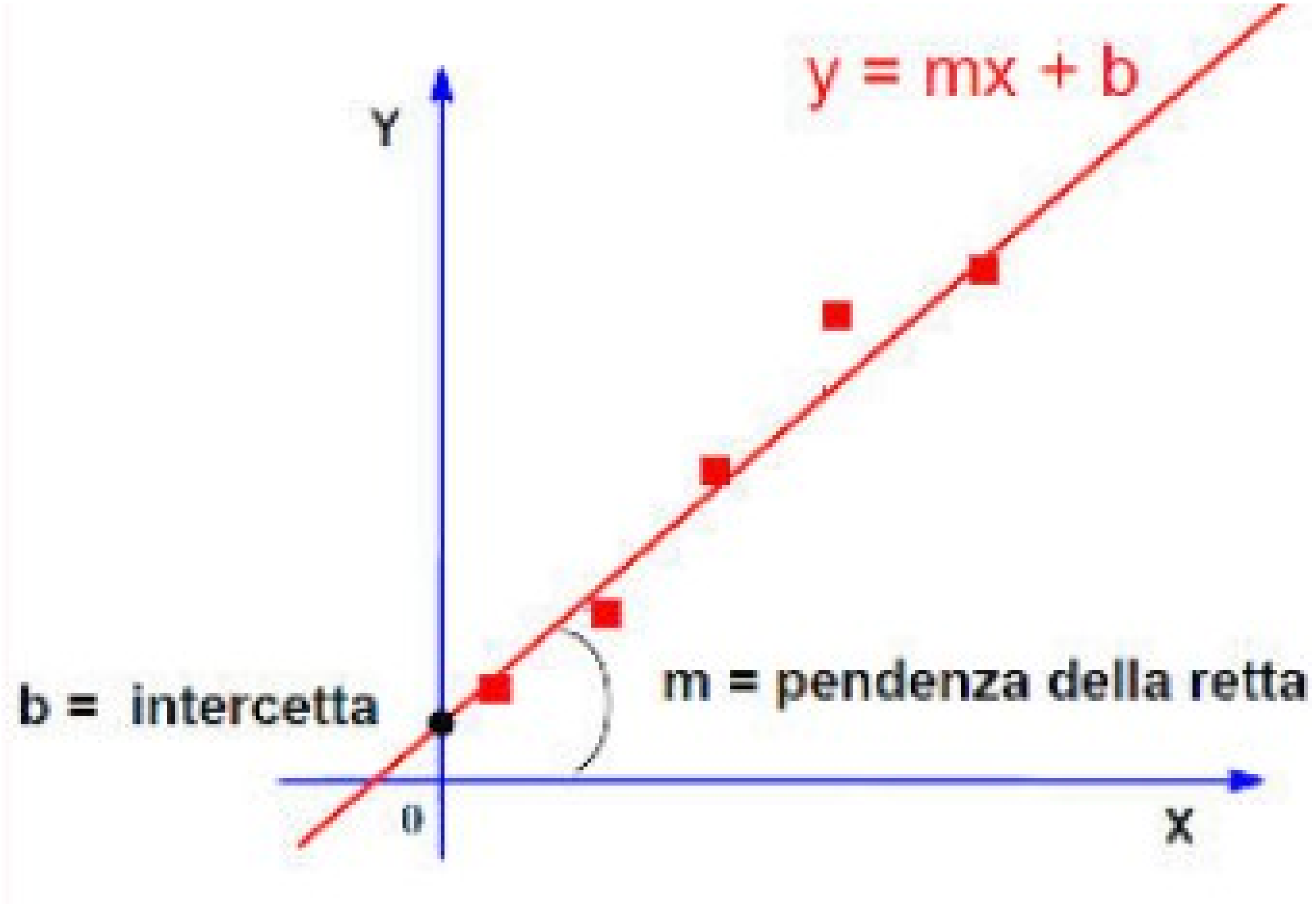
Tutorato Chimica analitica 2016/2017

Taratura di uno strumento

Tarare uno strumento significa determinare le costanti della funzione che lega le due grandezze, elaborando i dati ottenuti dalle analisi di campioni di riferimento

Curva di taratura

Solitamente abbiamo una retta, definita dall'equazione matematica y=mx+q



Curva di taratura

Attraverso la curva di taratura è possibile ricavare valori a partire da un segnale, qualora il coefficiente di correlazione R sia vicino a 1 (un buon coefficiente di correlazione è solitamente superiore a 0,99).
Tanto più è vicino a 1 tanto più il valore ricavato sarà affidabile.

Curva di taratura

es. Curva di dosaggio delle proteine

Utilizzando i valori di assorbanza, ottenuti da uno spettrofotometro, di un campione contenente delle proteine, è possibile tracciare una curva che considera i valori di assorbanza in funzione della concentrazione proteica. Conoscendo il valora dell'assorbanza misurata sperimentalmente di un campione proteico ignoto, è possibile ricavare la concentrazione di questo campione. Chiaramente la curva deve essere il più accurata possibile.

Curva di taratura

Per tracciare la curva si riportano sul grafico i valori delle misurazioni effettutate. In seguito vengono calcolate la pendenza *m* e l’intercetta q della retta.

Curva di taratura

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$$

S_{xx} e S_{yy} sono le devianze di x e y,

x_i , y_i , i-esima coppia di dati

concentrazione , segnale

$\bar{x}$, $\bar{y}$ medie dei valori di

concentrazione (x_i) e di segnale (y_i).

S_{xy} è la «codevianza» di x e y

Pendenza $m = S_{xy} / S_{xx}$

Intercetta $b = \bar{y} - m \cdot \bar{x}$

Curva di taratura

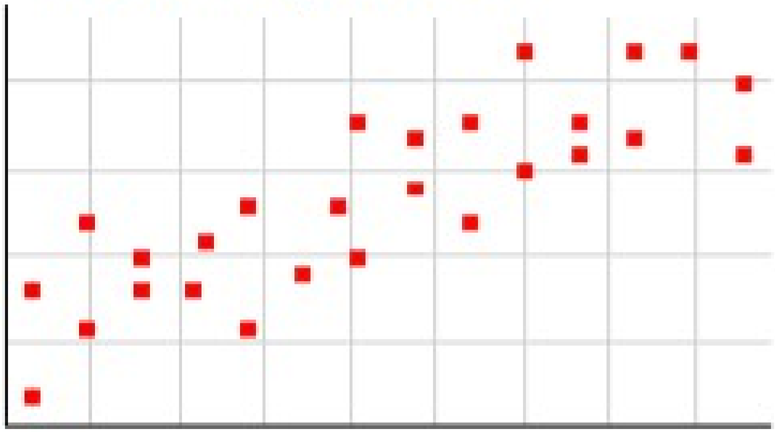
$$r = \frac{\sum_i \left[\left(x_i - \overline{x} \right) \left(y_i - \overline{y} \right) \right]}{\left\{ \left[\sum_i \left(x_i - \overline{x} \right)^2 \right] \left[\sum_i \left(y_i - \overline{y} \right)^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$-1 \leq r \leq +1$

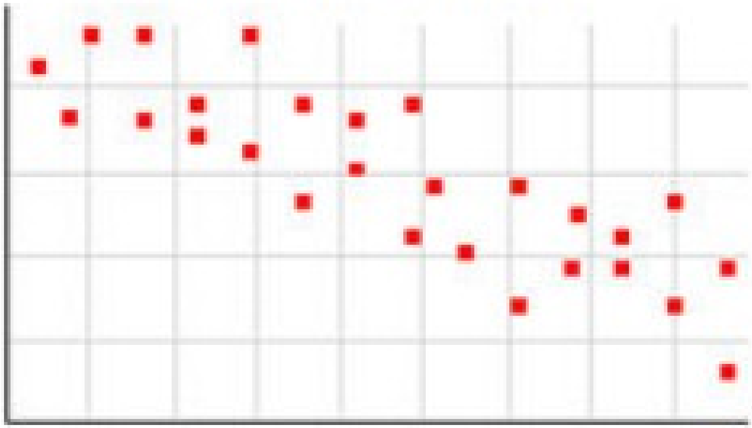
$$r = S_{xy} / (S_{xx} \cdot S_{yy})^{1/2}$$

Correlazione tra variabili

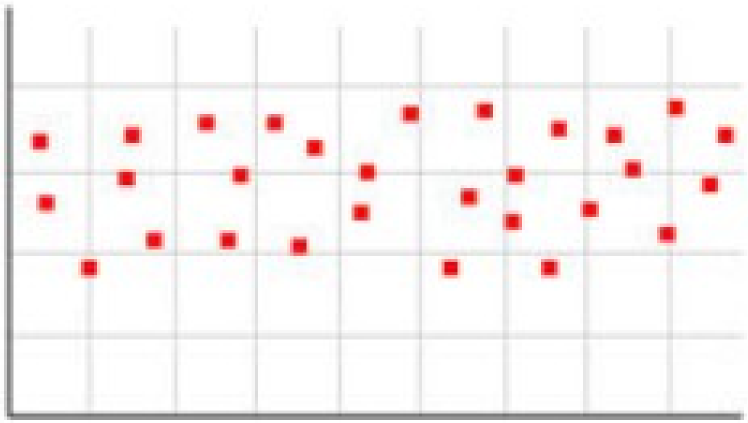
POSITIVA, $0 < r \leq 1$



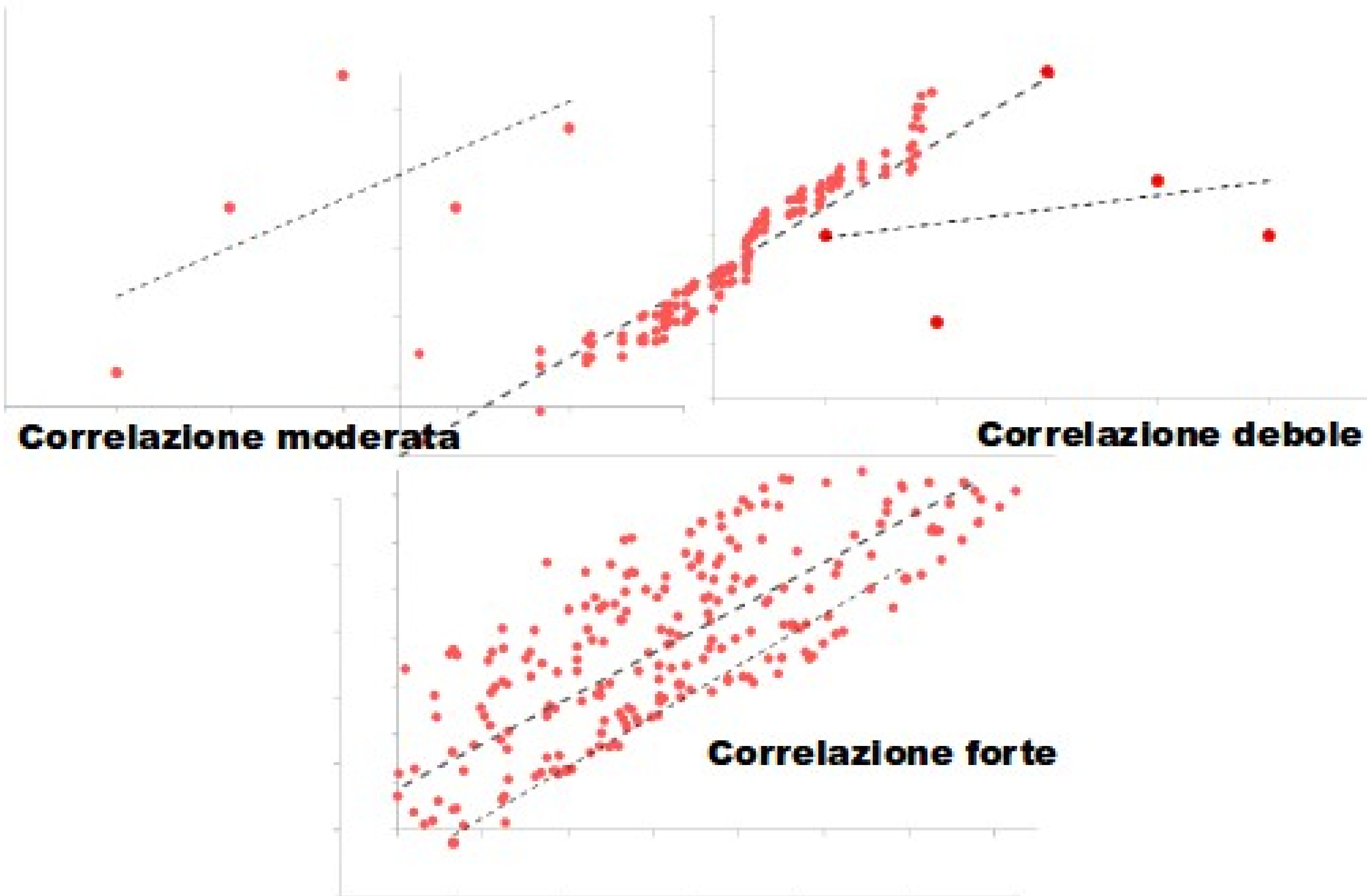
NEGATIVA, $-1 < r \leq 0$



ASSENZA DI CORRELAZIONE, $r \sim 0$



Qualità della correlazione



Curva di taratura

La covarianza è il grado di variazione simultanea tra x e y rapportata alle loro variazioni di x e y separatamente, espressa dalle loro deviazioni standard.

$$r = \frac{\sum_i \left[\left(x_i - \bar{x} \right) \left(y_i - \bar{y} \right) \right]}{\left\{ \left[\sum_i \left(x_i - \bar{x} \right)^2 \right] \left[\sum_i \left(y_i - \bar{y} \right)^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

$$-1 \leq r \leq +1$$

$$r = S_{xy} / (S_{xx} \cdot S_{yy})^{1/2}$$

Curva di taratura

La curva migliore è quella che passa più vicina ai punti sperimentali.

Si definiscono *residui* le differenza tra i valori di y sperimentali, *yi,* e quelli corrispondenti calcolati dal modello y*icalc.*

Residuo i-esimo = yi-yicalc

Se parliamo di una retta, il modello migliore è quello che hai i coefficienti *m* e *q* tali per cui la somma dei quadrati dei residui sulle y sia minima

Curva di taratura

$$SS_{residui} = \sum(y_i - y_{i\ calc})^2 = \sum[y_i - (mx_i + b)]^2 \rightarrow \text{MINIMO}$$

L'analisi dei residui è il metodo più semplice, immediato e robusto per stimare la qualità del modello scelto per rappresentare i dati sperimentali.

Il Bianco

Campione di riferimento per la taratura dello strumento. E’ un valore di riferimento per rilevare la variazione delle misurazioni.

In pratica viene sottoposta a misurazione la sola matrice.

Il bianco

L'*intercetta* è il segnale dello strumento per il bianco, laddove la *pendenza* è la sensibilità del metodo.

LIMITE DI RIVELABILITÀ (LDR)
LIMIT OF DETECTION (LOD)

concentrazione di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco

L.O.D. ≥ Segnale medio del bianco + 3*S_b

S_b è la deviazione standard del segnale misurato in una serie abbastanza numerosa di analisi di campioni-bianco (6-10 campioni)

L'analita è osservabile

LIMITE DI QUANTIFICAZIONE (LDQ)
LIMIT OF QUANTIFICATION (LOQ)

1. concentrazione al di sopra del quale è possibile eseguire misure quantitative
2. concentrazione al di sopra della quale l'incertezza di misura è accettabile per gli scopi dell'analisi

L.O.Q. ≥ Segnale medio del bianco + $K^{*}S_b$

S_b è la deviazione standard di una serie di numerose analisi di campioni di bianco (6-10),
K è un fattore che può valere da 5 a 10.

L'analita è quantificabile

Cenno sulla regressione lineare semplice (rls) univariata

Il modello che descrive la relazione tra la variabile indipendente X e la variabile dipendente Y è

$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X + E$

β_0, è l'intercetta e rappresenta il valore di Y per X = 0;
β_1, è il coefficiente di regressione e rappresenta la variazione di Y per una variazione unitaria di X;
E, rappresenta l'errore casuale, ossia la parte di Y che non è spiegata dal modello della relazione con X.

Il metodo dei minimi quadrati trova gli stimatori b_0 e b_1 dei coefficienti «veri» β_0 e β_1 che minimizzano la somma dei residui R_i per ogni valore di X_i:

$R_i = Y_{i\,(sperimentale)} - Y_{i\,(modello)} = Y_{i\,(sperimentale)} - (b_0 + b_1 \cdot X_i)$

Metodo dei minimi quadrati

Il metodo dei minimi quadrati si usa nel 99% dei casi nelle scienze chimiche-farmaceutiche, ma bisogna sempre verificare queste 4 ipotesi fondamentali sugli errori Ei:

1. sono variabili casuali solo sulle Y (!);
2. hanno media = 0
3. hanno tutti uguale varianza – ipotesi di omoschedasticità

(varianza Y non troppo diversa agli estremi dell’intervallo di

variazione di X)

Il metodo dei minimi quadrati trova i migliori stimatori b_0 e b_1 dei coefficienti «veri» β_0 e β_1.

Se valgono le ipotesi fatte circa X, Y e la distribuzione dell'errore E sulle Y, allora si può usare il test t sugli stimatori b_0 e b_1 per stabilire se sono *statisticamente significativi*.

In particolare, si può formulare l'ipotesi nulla H_0

H_0: $b_i = 0$, con $i = 0,1$ e l'ipotesi alternativa H_1: $b_i \neq 0$, $i=0,1$

Così si può calcolare il valore di t per ognuno dei coefficienti usando la relazione:

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

Dal confronto del valore di t_{calc} con il valore di t critico nelle tabelle si potrà stabilire il livello di significatività statistica della differenza, e quindi del coefficiente.

La media stimata è il coefficiente calcolato, mentre quella ipotizzata è $\mu = 0$. Al denominatore, l'errore standard è quello relativo allo specifico coefficiente calcolato.

E qui occorre introdurre altre tre equazioni

$$Errore\ standard\ della\ regressione:\ s = \sqrt{\frac{1}{n-2}\sum_{i=1}^{n}(y_i - y_{i\,calc})^2}$$

$$Errore\ standard\ della\ intercetta:\ s_{b0} = s \cdot \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}$$

$$Errore\ standard\ della\ pendenza:\ s_{b1} = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}}$$

Abbiamo definito tutti i termini del test di ipotesi sulla *significatività statistica* dei coefficienti e possiamo quindi svolgere i calcoli

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

L'ipotesi nulla è H_0: $b_i = 0$, i= 0, 1

l'ipotesi alternativa H_1: $b_i \neq 0$, i = 0, 1

$\bar{X}$ è in un caso uguale a b_0 e nell'altro a b_1, e questi sono rispettivamente l'intercetta e la pendenza della retta calcolati con il metodo dei minimi quadrati.

$\mu = 0$, nell'ipotesi nulla che abbiamo postulato;

s_{b0} e s_{b1} sono rispettivamente gli errori standard di intercetta e pendenza calcolati come illustrato

Usando la statistica del test t, i valori calcolati

$t(b_0)_{calc} = (b_0 - 0)/S_{b0}$

$t(b_1)_{calc} = (b_1 - 0)/S_{b1}$

sono da confrontare con il valore critico di t riportato nelle tabelle per il numero di gradi di libertà e il livello di significatività scelti.

Metodo dei minimi quadrati

La significatività dei coefficienti e l'errore associato alla loro misura dipende dall'errore commesso nella stima delle y, ma anche dalle distanze dei punti sulle x dal centro dell'intervallo in cui si studiano le x.

(*vedi errore standard della intercetta e della pendenza*)